



(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
24.07.1996 Patentblatt 1996/30

(51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/54**, C12N 9/10,
C12Q 1/48, A01N 3/00,
C12N 1/21, C12N 5/10

(21) Anmeldenummer: 96100458.7

(22) Anmeldetag: 13.01.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL

(30) Priorität: 23.01.1995 DE 19501906

(71) Anmelder: **BASF AKTIENGESELLSCHAFT**
67056 Ludwigshafen (DE)

(72) Erfinder:
• Schmidt, Ralf-Michael, Dr.
D-67434 Neustadt (DE)
• Stitt, Marc, Prof. Dr.
D-69221 Dossenheim (DE)
• Sonnewald, Uwe, Dr.
D-06467 Hoym (DE)

(54) **Transketolase**

(57) Protein mit Transketolase Aktivität, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ ID NO 2 darstellt, sowie für dieses Protein kodierende Nukleinsäuren und seine Verwendung.

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Proteine mit Transketolase Aktivität, ihre Verwendung in Testsystemen, sowie Nukleinsäuren, die für diese Proteine codieren.

Pflanzen sind in der Lage, unter Verwendung von Lichtenergie aus atmosphärischem Kohlendioxid organische Verbindungen unter Sauerstoffbildung aufzubauen. Dieser Vorgang wird als Photosynthese bezeichnet.

Es ist anzunehmen, daß die effiziente Bildung, Nutzung und Verteilung der Photosyntheseprodukte das Wachstum einer Pflanze stark beeinflussen.

Da Pflanzen auf eine funktionierende Photosynthese angewiesen sind und vergleichbare Reaktionen in tierischen Organismen nicht vorkommen, bietet sich der Photosyntheseapparat als ideales Ziel für den Einsatz von Herbiziden an.

Die komplexen Reaktionen, die zur Kohlendioxidfixierung führen unterteilt man in Licht- und Dunkelreaktion. Die Lichtreaktion dient der Bereitstellung von Energie in Form von ATP und von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH. In der Dunkelreaktion (reduktiver Pentosephosphatzyklus oder Calvin Zyklus) werden diese Verbindungen zur Synthese organischer Kohlenstoffverbindungen genutzt.

Einige der bekannten Herbizide (z.B. Dichlorphenylmethylharnstoff oder Paraquat) wirken durch eine Inhibierung der Lichtreaktion. Die Dunkelreaktion wird als Angriffspunkt für Herbizide nicht genutzt.

Die Enzymreaktionen des reduktiven Pentosephosphatzyklus werden in drei Abschnitte unterteilt:

- a) Carboxylierung
- b) Reduktion
- c) Regenerierung.

Bei der Carboxylierung reagiert Kohlendioxid mit dem Akzeptormolekül Ribulose-Bisphosphat (RuBP), wodurch zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat

(3-PGA) gebildet werden. Anschließend wird 3-PGA nach Phosphorylierung zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) reduziert. In der Regenerationsphase wird das Akzeptormolekül RuBP aus dem entstandenen GAP resynthetisiert. Von sechs gebildeten Molekülen GAP kann ein Molekül für andere Stoffwechselwege eingesetzt werden.

Eine Vielzahl der am reduktiven Pentosephosphatzyklus beteiligten Enzyme stellen potentielle Angriffspunkte für Herbizide dar. Eine besondere Stellung nimmt allerdings die plastidäre Transketolase ein. Wie die Transaldolase katalysiert die Transketolase (E.C. 2.2.1.1.) zwei Reaktionen:

(1)

Fruktose-6-Phosphat + Glycerinaldehyd-3-Phosphat --> Erythrose-4-Phosphat + Xylulose-5-Phosphat

(2)

Sedoheptulose-7-Phosphat + Glycerinaldehyd-3-Phosphat --> Ribose-5-Phosphat + Xylulose-5-Phosphat

Die an den Reaktionen beteiligten Substrate und Produkte stellen Verknüpfungspunkte des reduktiven Pentosephosphatzyklus mit anderen Stoffwechselwegen dar. Exportierte Triosephosphate dienen im Zytoplasma als Substrate für Glykolyse und Gluconeogenese. Fruktose-6-Phosphat wird als Vorläufermolekül zur Herstellung von Stärke in den Plastiden genutzt. Erythrose-4-Phosphat ist ein Mittler zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel. Verknüpft mit Phosphoenolpyruvat mündet Erythrose-4-Phosphat in den Shikimat-Weg, der zur Synthese aromatischer Aminosäuren und phenolischer Substanzen führt.

Ribose-5-Phosphat wird in unterschiedlichen Stoffwechselwegen als Substrat verwendet.

In pflanzlichen Geweben wurden zwei Transketolase-Isoformen beschrieben, die sich in ihrer subzellulären Kompartimentierung unterscheiden (Murphy and Walker, 1982, Planta 155, 316-320).

Die plastidäre Transketolase ist in grünen Geweben für mehr als 75% der Gesamtaktivität verantwortlich. Das aktive Enzym liegt als Homotetramer (Holoenzym) mit einer relativen Molekularmasse von 150 kDa vor. Als Cofaktoren benötigt die Transketolase Vitamin B1 (Thiaminpyrophosphat) und Magnesium. In Abwesenheit von Thiaminpyrophosphat oder in Anwesenheit von Mercaptoethanol zerfällt das Tetramer in zwei Dimere (Apoenzyme) mit einer relativen Molekularmasse von je 74 kDa. Holo- und Apoenzym sind katalytisch aktiv, wobei das Holoenzym eine wesentlich höhere Aktivität als das Apoenzym aufweist.

Gene, die für Transketolase kodieren, wurden bisher aus *Saccharomyces cerevisiae* (Flechter et al., Biochemistry 31, 1892-1896, 1993; Sundström et al., J. Biol. Chem. 268, 24346-24352, 1993; Schaff-Gerstenschläger et al., Eur. J. Biochem. 217, 487-492, 1993), aus *Hansenula polymorpha* (Janowicz et al., Nucl. Acids Res. 13, 3043-3062, 1985), menschlichen Erythrozyten (Abedinia et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 183, 1159-1166, 1992; McCool et al., J. Biol. Chem. 268, 1397-1404, 1993), *Rhodobacter sphaeroides* (Chen et al., J. Biol. Chem. 266, 20447-20452, 1992)

und Escherichia coli (Sprenger, Biochem. Biophys. Acta 1216, 307-310, 1992; Tida et al., J. Bacteriol. 175, 5375-5383, 1993) isoliert und beschrieben. Gene pflanzlicher Transketolasen sind bisher nicht bekannt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, eine pflanzliche Transketolase in reiner Form durch Klonierung des entsprechenden Gens zur Verfügung zu stellen.

5 Demgemäß wurde ein Protein mit Transketolase Aktivität, enthaltend die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz, gefunden.

Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz beruht auf der Translation der in SEQ ID NO 1 dargestellten cDNA Sequenz.

Das in SEQ ID NO 2 dargestellte Protein ist ein sogenanntes Vorläuferprotein bestehend aus 743 Aminosäuren.
10 Das reife Protein ist aus der Vorläuferform durch Abspalten des chloroplastidären Transitpeptides, das gemäß einer Computeranalyse aus den N-terminalen 77 Aminosäuren besteht, erhältlich.

Sowohl das Vorläuferprotein, als auch durch Substitution, Deletion oder Insertion von Aminosäuren davon abgeleitete Proteine, die noch über eine Transketolase-Aktivität verfügen, gehören zu den erfindungsgemäßen Proteinen.

Unter Substitution ist der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere andere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure
15 eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Val durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung; bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

20 Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch eine oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Besonders bevorzugt sind Proteine, die durch N-terminale Verkürzungen um 20 bis 100 Aminosäuren aus SEQ ID NO 2 entstehen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuren, die für die oben genannten Proteine kodieren. Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code
25 erhältlich. Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismus spezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

Soll die pflanzliche Transketolase beispielsweise in einem Bakterium exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage des Bakteriums bei der Rückübersetzung zu verwenden.
30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Vektoren, die die für die erfindungsgemäße Transketolase kodierenden Nukleinsäuren zusammen mit funktionellen Regulationssignalen enthalten.

Darunter sind beispielsweise Signale für Transkription und Translation wie Promotoren und Ribosomenbindungsstellen oder für Replikation oder Integration notwendige Sequenzen zu verstehen.

35 Die erfindungsgemäßen Proteine eignen sich besonders zur Identifizierung von herbiziden Wirkstoffen, insbesondere zur Auffindung von Transketolase spezifischen Hemmstoffen.

Dazu können die Proteine beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der Transketolase in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes
40 machen.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide Eigenschaften überprüft werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Herbizide, die mit einem oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

45 Die Erfindung besteht außerdem in einem Verfahren zur Herstellung von Herbiziden, die eine pflanzliche Transketolase inhibieren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man bekannte chemische Verbindungen in einem oben beschriebenen Testverfahren überprüft und solche mit inhibierender Wirkung mit üblichen Träger- und Hilfsstoffen als Herbizid formuliert.

Daß die Transketolase inhibierende Eigenschaft einer Substanz allein nicht ausreicht für die Eignung als Herbizid, sondern noch weitere Prüfungen durchzuführen sind, ist jedem Fachmann geläufig.
50

Das Verfahren gestattet es jedoch reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter veranschaulicht.

55

Beispiele

A. Gentechnische Verfahren, die den Ausführungsbeispielen B zugrundeliegen:

5 1. Allgemeine Klonierungsverfahren

Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt. Transformation und Anzucht von *Pichia pastoris* wurde entsprechend den Angaben der Vertreiberfirma (Invitrogen Corporation) durchgeführt. Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurde entsprechend der Methode von Höfgen und Willmitzer (Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877) ausgeführt. Die Anzucht der Agrobakterien erfolgte in YEB Medium (Verviet et al. J. Gen. Virol. (1975) 26, 33).

15 2. Erzeugung von cDNA-Bibliotheken

Zur Herstellung von Blatt-spezifischen cDNA Bibliotheken wurde Gesamt-RNA aus Tabakblättern nach einer von Logemann et al. (Anal. Biochem. (1987) 163,21) beschriebenen Methode isoliert. Anschließend wurde die poly(A)-RNA über Oligo(dT)-Cellulose Type 7 (Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurden 5 µg der so erhaltenen RNA für die cDNA Synthese eingesetzt. Alle für die Herstellung der cDNA notwendigen Chemikalien und Enzyme wurden durch die Firma Stratagene (La Jolla CA 92037, USA) bezogen. Die angewandten Methoden wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Synthese des ersten und zweiten Stranges der cDNA wurde mit dem ZAP-cDNA Synthese Kit durchgeführt. Die erhaltenen doppelsträngigen cDNAs wurden anschließend mit EcoRI-NotI Adaptoren versehen und in einen EcoRI gespaltenen Lambda ZAPII Vektor kloniert. Nach in vitro Verpackung (Gigapack II Verpackungsextrakt) der rekombinanten Lambda DNA wurden XL-1 *E. coli* Zellen (Stratagene) transformiert. Durch Auszählen der gebildeten Plaques wurde der Titer der cDNA-Bibliotheken bestimmt.

30 3. Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek mittels heterologer DNA-Sonden

2 x 10⁵ rekombinante Lambda Phagen (Lambda ZapII) einer blattspezifische cDNA-Bibliothek aus Tabak (Varietät Samsun NN) wurden auf Agarplatten ausplattiert. Die Phagen-DNA wurde mittels Standardverfahren (Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) auf Nylon-Membranen (Hybond N, Amersham Buchler) transferiert und durch Inkubation für 2 Stunden bei 80°C auf den Filtern fixiert. Als Hybridisierungssonden dienten DNA-Fragmente, die mit Hilfe eines "Multiprime DNA labelling systems" (Amersham Buchler) in Anwesenheit von α-³²P-dCTP (spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol) nach Herstellerangaben radioaktiv markiert wurden. Hybridisierung der Membran erfolgte nach Prähybridisierung bei 42°C in PEG-Puffer (Amasino (1986) Anal. Biochem. 152, 304-307) für 12-16 Stunden. Anschließend wurden die Filter 3 x 20 Minuten in 2 x SSC, 0,1 % SDS bei 42°C gewaschen. Positiv hybridisierende Phagen wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und durch Standardtechniken gereinigt.

40 4. Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem automatischen Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer (A.L.F.) der Firma Pharmacia unter Verwendung Fluoreszenz-markierter Oligonukleotide nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467).

45 5. Bakterienstämme und Hefestämme

E. coli (XL-1 Blue) Bakterien wurden von der Firma Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation eingesetzte *Agrobacterium tumefaciens* Stamm (C58Cl mit dem Plasmid pGV 3850kan) wurde von Debleare et al. (1985, Nucl. Acid Res. 13, 4777) beschrieben. *Pichia pastoris* Stamm GS115 wurde von der Firma Invitrogen Corporation (San Diego, CA 92121, USA) bezogen.

50 6. Tabaktransformation

Zur Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN) wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtskultur von *Agrobacterium tumefaciens* abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Bakterien im gleichen Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakterienlösung gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, Physiol. Plant. (1962) 15,473) mit 2 % Saccharose und 0,8 % Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100 mg/l Kanamycin, 500 mg/l Claforan, 1 mg/ml Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphthylthylsäure (NAA), 1,6 % Glukose und 0,8 % Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht/8 Stunden

Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt.

7. Analyse von Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben

5 Gesamt RNA aus pflanzlichen Geweben wurde wie bei Logemann et al. (Anal. Biochem. (1987) 163,21) beschrieben isoliert. Für die Analyse wurden jeweils 20-40 µg RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA Moleküle wurde die RNA mittels Kapillarttransfer auf eine Nylon Membran übertragen. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei Amasino (Anal. Biochem. (1986) 152, 304) beschrieben durchgeführt. Die als Sonde eingesetzten cDNA-Fragmente wurden mit einem Ran-

10 dom Primed DNA Labeling Kit (Boehringer, Mannheim) radioaktiv markiert.

8. PCR-Amplifikation von Nukleinsäuren

Die PCR-Amplifikation der Transketolase zur Expression des Enzyms in *E. coli* und *Pichia* wurde in einem DNA-Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Reaktionsgemische enthielten 1 ng Template, 0,5 µM der entsprechenden Oligonukleotide, 0,25 mM Nukleotide (Pharmacia), Amplifikationspuffer (16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25°C), 0,01 % Tween

15 20, 7,5 mM MgCl₂) und 2,5 Einheiten der Tth DNA Polymerase (Biomaster, Crottorf Str. 25, 51109 Köln). Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

20 Anlagerungstemperatur: 60°C
Denaturierungstemperatur: 94°C
Elongationstemperatur: 72°C
Anzahl der Zyklen: 30

9. Überexpression von Proteinen in *E. coli*

25 Zur Überexpression der Transketolase in *E. coli* wurden 2 ml einer bei 28°C angezogenen Übernachtskultur in 20 ml Wachstumsmedium (LB-Medium komplettiert mit 10 µg/ml Tetracyclin, 200 µg/ml Ampicillin, 1 mM Vitamin B1, 1 mM MgSO₄) überführt. Das Wachstum erfolgte bei 28°C unter Schütteln. Nach 3 Stunden wurde die Expression der Transketolase durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert. Der Nachweis des produzierten Proteins wurde durch

30 Auftrennung der Proteine in einem SDS-PAAG (Laemmli (1970) Nature 227, 680-685) mit anschließender Coomassie-Färbung der Proteine durchgeführt.

B. Ausführungsbeispiele

1. Klonierung der plastidären Transketolase

35 Aus einer blattspezifischen cDNA-Bibliothek aus Tabak (Varietät Samsun NN) wurde ein Klon, der für Transketolase kodiert, ausgewählt. Die DNA Sequenz ist in SEQ ID NO 1 dargestellt.
Der 2629 Basenpaar lange cDNA-Klon 21 enthält einen offenen Leseraster von 2229 Basen und kodiert für ein Protein mit 743 Aminosäuren. Analyse des Polypeptides unter Verwendung des Sequenzprogramms PC/Gene (Untermenü TRANSPER) ergab, daß am N-Terminus des Proteins ein chloroplastidäres Transitpeptid von vermut-

40 lich 77 Aminosäuren vorhanden ist.

2. Vergleich der plastidären Transketolase aus Tabak mit bekannten Transketolase Proteinsequenzen

45 Homologievergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Klons TK-23 (MacMolly Sequenzanalyse Programm von Macintosh) mit publizierten Transketolase-Sequenzen ergaben, daß im Bereich des vermutlich reifen Polypeptides (Aminosäure 78 bis 743) die höchsten Homologien zu Transketolasen aus *Saccharomyces cerevisiae* bestehen (Abbildung 4). Die Sequenz des reifen Proteins (bestimmt durch Computervorhersage) ist zu 47,7 % bzw. 44,1 % identisch mit der Transketolase 1 bzw. 2 Sequenz aus *Saccharomyces cerevisiae*. Geringere Sequenzhomologien wurden zu den übrigen Transketolasen gefunden. Keine Sequenzhomologie wurde für den Bereich

50 des Transitpeptides ermittelt.

3. Expressionsanalyse der plastidären Transketolase

Expressionsanalysen einiger am Calvin Zyklus beteiligter Enzyme (RUBISCO, FBPase) haben ergeben, daß die Akkumulation der entsprechenden Transkripte an grünes Gewebe und Licht gebunden ist. Zur Überprüfung der

55 gewebespezifischen Expression der Transketolase in Tabakpflanzen wurde Gesamt-RNA aus Sinkblättern, Sourceblättern, Blütenknospen, Stengeln (Internodien, Nodien und Mark), Wurzeln und geöffneten Blüten wachsender Tabakpflanzen isoliert. Nach Auftrennung in Agarosegelen und Bindung der RNA auf Nylonmembranen wurde die Anwesenheit Transketolase spezifischer Transkripte durch Hybridisierung mit der radioaktiven TK-23 cDNA nachgewiesen. Wie in Abbildung 5 dargestellt, sind Transketolase-spezifische Transkripte in allen getesteten

Organen nachweisbar. Dieser Befund verdeutlicht, daß im Gegensatz zu anderen Enzymen des Calvin Cyclus, die Transketolase neben ihrer Funktion im Calvin Cyclus weitere Aufgaben im pflanzlichen Stoffwechsel erfüllt.

4. Antisenseinhibierung der Transketolase in transgenen Tabakpflanzen

Um transgene Tabakpflanzen mit verminderter Transketolaseaktivität zu erzeugen, wurden die cDNA Klone TK-26 und TK-28 in Gegenrichtung mit einem eine konstitutive Expression bewirkenden Promotor sowie einem pflanzlichen Terminationssignal versehen. Die Plasmide BinAR-anti-TK-26 und BinAR-anti-TK-28 bestehend aus den drei Fragmenten A, der jeweiligen cDNA (s. Abb. 6, TK-26 und TK-28) und C wurden durch Insertion der entsprechenden cDNA Sequenzen in den Expressionsvektor pBinAR (Abb. 7A) erzeugt.

Das Fragment A beinhaltet den 35S CaMV Promoter. Es enthält ein Fragment, welches die Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik Virus (CaMV) umfaßt (Franck et al. (1980) Cell 21, 285). Es wurde als EcoRI-KpnI Fragment aus dem Plasmid pDH51 (Pietrzak et al. (1986) Nucleic. Acid Res. 14, 5857) isoliert. Die TK-26 cDNA wurde aus dem pBluescript SK- (Abb. 6) als XbaI-SalI Fragment und die TK-28 cDNA als BamHI Fragment in Gegenrichtung in den pBinAR Vektor kloniert (Abb. 7B und C). Das Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984); EMBO J. 3, 835), Nukleotide 11749-11939, welches als PvuII-HindIII Fragment aus dem Plasmid pAGV 40 (Herrera-Estrella et al. (1983); Nature 303,209) isoliert worden ist und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII Schnittstelle des Vektors kloniert worden war.

Die erhaltenen Plasmide wurden mit Hilfe des Agrobacteriumsystem in Tabak transformiert. Transformierte Tabakpflanzen wurden auf Antibiotika haltigem Medium angezogen und die erfolgreiche Inhibierung der Transketolase wurde durch Bestimmung der Transkriptmenge mittels Northern Experimenten ermittelt. Für jede Transformation (TK-26 und TK-28) wurden 100 unabhängige Transformanten untersucht. In Abbildung 8 ist das Ergebnis eines Northern-Experimentes dargestellt. In den meisten regenerierten Pflanzen konnte keine Reduktion der Transketolase mRNA nachgewiesen werden. Einige der Pflanzen zeigten allerdings eine starke Verminderung der Transketolase-spezifischen Transkripte (z.B. anti-TK-26 No. 26; Abb. 8). Die Reduktion der Transkriptmenge führte zu einer Unterdrückung des Pflanzenwachstums. Transfer der Pflanzen ins Gewächshaus führte zu einem Absterben der inhibierten Pflanzen.

5. Herstellung des Plasmides TK23-AC-pQE-9

Zur Etablierung eines molekularen Testsystems wurde die pflanzliche Transketolase in mikrobiellen Systemen überexprimiert.

Zur Expression der Transketolase in E. coli wurde die TK-23 Sequenz, die für das reife Polypeptid kodiert, unter Verwendung der Primer A und C (s. Abb. 9) amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert (Gentechnische Verfahren, Absatz 8). Das TK23-AC PCR-Amplifikationsprodukt wurde anschließend als SalI Fragment in die SalI-Schnittstelle des Vektors pQE-9 (DIAGEN GmbH, QLAGEN Inc.) kloniert (Abb. 10).

6. Herstellung des Plasmides TK23-AC-pPIC-9 und TK23-BC-pHIL-D2

Da eukaryotische Enzyme häufig nur unzureichend in bakteriellen Systemen exprimiert werden können, wurden zwei weitere Plasmidkonstruktionen durchgeführt, die eine Expression in Pichia pastoris (Stamm GS115; Firma Invitrogen Corporation San Diego, CA 92121, USA) ermöglichen.

Zur Sekretion des Transketolase Proteins wurde das Plasmid TK23-AC-pPIC-9 konstruiert. Zur Fusion des Transketolase Proteins mit einem Hefe Signalpeptid wurde ein Teil der TK-23 Sequenz, der für das reife Polypeptid kodiert, unter Verwendung der Primer A und C (s. Abb. 9) amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert (Gentechnische Verfahren, Absatz 8). Das TK23-AC PCR-Amplifikationsprodukt wurde anschließend als EcoRI-Fragment in die EcoRI-Schnittstelle des Vektors pPIC-9 des Pichia Expressions Kit (Invitrogen) kloniert (Abb. 11). Um eine intrazelluläre Akkumulation des Transketolase Enzyms zu gewährleisten wurde das Plasmid TK23-BC-pHIL-D2 hergestellt. Zur besseren Aufreinigung des Enzyms wurde ein 5'-PCR Primer (s. Abb. 9) zur Amplifikation der Transketolase verwendet, der ein Startkodon für die Translation enthält und für sechs Histidinreste kodiert. Nach PCR-Amplifikation der in Abbildung 9 angegebenen TK-23 Sequenz wurde das TK-23-BC-Produkt in den Vektor pGEM-T kloniert. Das TK23-BC PCR-Amplifikationsprodukt wurde anschließend als EcoRI-Fragment in die EcoRI-Schnittstelle des Vektors pHIL-D2 des Pichia Expressions Kit (Invitrogen) kloniert (Abb. 12).

7. Expression der pflanzlichen Transketolase in E. coli

Zur Überexpression der Transketolase in E. coli wurden 2 ml LB-Medium mit XL-1 E-coli Zellen beimpft, die das Plasmid TK23-AC-pQU-9 enthielten. Die Kulturen wurden über Nacht bei 28°C in Anwesenheit von Antibiotika und unter Schütteln angezogen. Anschließend wurden die Übernachtskulturen in 20 ml Wachstumsmedium (LB-Medium komplettiert mit: 10 µg/ml Tetracyclin, 200 µg/ml Ampicillin, 1 mM Vitamin B1, 1mM MgSO₄) überführt. Das Wachstum erfolgte bei 28°C unter Schütteln. Nach 3 Stunden wurde die Expression der Transketolase durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert. Der Nachweis des produzierten Proteins wurde durch Auftrennung der Proteine

in einem SDS-PAAG (Laemmli (1970) Nature 227, 680-685) mit anschließender Coomassie-Färbung der Proteine durchgeführt. Als Kontrollen dienten Kulturen, die entweder nicht mit IPTG induziert wurden, oder Kulturen, die die Transketolase in Gegensinnorientierung enthielten. Das Ergebnis eines Induktions-Experimentes ist in Abbildung 13 dargestellt. Ein Protein der entsprechenden Größe akkumulierte in Bakterienkulturen, die mit IPTG induziert wurden und das Plasmid TK23-AC-pQE-9 enthielten. Die Akkumulation beginnt eine Stunde nach Induktion. In den Kontrollen (ohne IPTG bzw. Transketolase in Gegensinnorientierung) ist kein vergleichbares Protein identifizierbar.

Abbildungen

1. Reduktiver Pentosephosphatzyklus
2. Verknüpfung des Pentosephosphatzyklus mit anderen Stoffwechselwegen
3. Nukleotidsequenz der plastidären Transketolase aus Tabak
4. Aminosäurevergleich der plastidären Transketolase mit Transketolase 1 und 2 aus Hefe
5. Nachweis der Transketolase mRNA in unterschiedlichen Tabakgeweben
6. Schematische Darstellung der Transketolase cDNA-Klone
7. Schematische Darstellung der Plasmide BinAR-TK-26-anti und BinAR-TK-28-anu
8. Northernanalyse transgener Tabakpflanzen
9. Strategie und Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation der plastidären Transketolase
10. Schematische Darstellung des Plasmides TK23-AC-pQE-9
11. Schematische Darstellung des Plasmides TK23-AC-pPIC-9
12. Schematische Darstellung des Plasmides TK23-BC-pHIL-D2
13. Überexpression der pflanzlichen Transketolase in E. coli

SEQUENZPROTOKOLL

5

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

10

(A) NAME: BASF Aktiengesellschaft

(B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38

15

(C) ORT: Ludwigshafen

(E) LAND: Bundesrepublik Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: D-67056

20

(G) TELEPHON: 0621/6048526

(H) TELEFAX: 0621/6043123

25

(I) TELEX: 1762175170

(ii) ANMELDETITEL: Transketolase aus Pflanzen

30

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

35

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

40

(A) LÄNGE: 2629 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Nicotiana

(ix) MERKMALE:

50

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LÄGE: 60..2289

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

55

EP 0 723 017 A2

	CTCCTCTTCA CTCTCTTTTC TCTTTGAGAC AAAACATCAA ACACCTTACT GGTAAGCC	59
	ATG GCG TCT TCT TCT TCT CTC ACT CTC TCT CAA GCT ATC CTC TCT CGT	107
5	Met Ala Ser Ser Ser Ser Leu Thr Leu Ser Gln Ala Ile Leu Ser Arg	
	1 5 10 15	
	TCT GTC CCT CGC CAT GGC TCT GCC TCT TCT TCT CAA CTT TCC CCT TCT	155
	Ser Val Pro Arg His Gly Ser Ala Ser Ser Ser Gln Leu Ser Pro Ser	
	20 25 30	
10	TCT CTC ACT TTT TCC GGC CTT AAA TCC AAT CCC AAT ATC ACC ACC TCC	203
	Ser Leu Thr Phe Ser Gly Leu Lys Ser Asn Pro Asn Ile Thr Thr Ser	
	35 40 45	
	CGC CGC CGT ACT CCT TCC TCC GCC GCC GCC GCC GTC GTA AGG TCA	251
15	Arg Arg Arg Thr Pro Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Val Val Arg Ser	
	50 55 60	
	CCG GCG ATT CGT GCC TCA GCT GCA ACC GAA ACC ATA GAG AAA ACT GAG	299
	Pro Ala Ile Arg Ala Ser Ala Ala Thr Glu Thr Ile Glu Lys Thr Glu	
	65 70 75 80	
20	ACT GCG CTT GTT GAC AAA TCT GTA AAC ACG ATT CGA TTT TTG GCT ATT	347
	Thr Ala Leu Val Asp Lys Ser Val Asn Thr Ile Arg Phe Leu Ala Ile	
	85 90 95	
	GAT GCT GTT GAA AGG CAA ATT CGG GTC ACC CGG TTT GCC ATG GGT TGT	395
25	Asp Ala Val Glu Arg Gln Ile Arg Val Thr Arg Phe Ala Met Gly Cys	
	100 105 110	
	GCT CCG ATG GGT CAT ATA TTG TAC GAT GAG GTT ATG AGG TAT AAC CCG	443
	Ala Pro Met Gly His Ile Leu Tyr Asp Glu Val Met Arg Tyr Asn Pro	
	115 120 125	
30	AAA AAC CCG TAT TGG TTT AAT CGG GAT CGG TTT GTT CTA TCA GCT GGA	491
	Lys Asn Pro Tyr Trp Phe Asn Arg Asp Arg Phe Val Leu Ser Ala Gly	
	130 135 140	
	CAT GGT TGT ATG CTT CAG TAT GCT TTG CTT CAT CTA GCT GGC TAT GAT	539
35	His Gly Cys Met Leu Gln Tyr Ala Leu Leu His Leu Ala Gly Tyr Asp	
	145 150 155 160	
	GCT GTC AGG GAA GAG GAC TTG AAG AGC TTC CGT CAG TGG GGA ACC AAA	587
	Ala Val Arg Glu Glu Asp Leu Lys Ser Phe Arg Gln Trp Gly Thr Lys	
	165 170 175	
40	ACC CCT GGA CAC CCT GAA AAC TTT GAG ACA CCT GGT GTT GAA GTC ACC	635
	Thr Pro Gly His Pro Glu Asn Phe Glu Thr Pro Gly Val Glu Val Thr	
	180 185 190	
	ACC GGG CCT CTG GGA CAA GGT ATT GCC AAC GCC GTT GGC TTG GCT CTT	683
45	Thr Gly Pro Leu Gly Gln Gly Ile Ala Asn Ala Val Gly Leu Ala Leu	
	195 200 205	
	GTG GAG AAA CAC TTG GCT GCT CGT TTC AAT AAG CCT GAC GCT GAG ATT	731
	Val Glu Lys His Leu Ala Ala Arg Phe Asn Lys Pro Asp Ala Glu Ile	
	210 215 220	
50	GTA GAC CAC TAC ACA TAT GTT ATT CTC GGT GAT GGT TGC CAG ATG GAG	779
	Val Asp His Tyr Thr Tyr Val Ile Leu Gly Asp Gly Cys Gln Met Glu	
	225 230 235 240	

55

EP 0 723 017 A2

	GGT ATT TCA CAA GAA GCT TGT TCC CTT GCT GGA CAC TGG GGA CTT GGA	827
	Gly Ile Ser Gln Glu Ala Cys Ser Leu Ala Gly His Trp Gly Leu Gly	
	245 250 255	
5	AAG CTG ATT GCT TTC TAT GAT GAC AAC CAC ATC TCA ATT GAT GGT GAC	875
	Lys Leu Ile Ala Phe Tyr Asp Asp Asn His Ile Ser Ile Asp Gly Asp	
	260 265 270	
	ACA GAA ATC GCT TTC ACT GAG GAT GTT GGT GCC CGT TTT GAG GCT CTT	923
10	Thr Glu Ile Ala Phe Thr Glu Asp Val Gly Ala Arg Phe Glu Ala Leu	
	275 280 285	
	GGG TGG CAC GTA ATC TGG GTG AAG AAC GGT AAC ACT GGT TAT GAT GAG	971
	Gly Trp His Val Ile Trp Val Lys Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asp Glu	
	290 295 300	
15	ATT CGT GCT GCT ATT AAG GAA GCA AAA ACT GTC ACA GAC AAA CCC ACT	1019
	Ile Arg Ala Ala Ile Lys Glu Ala Lys Thr Val Thr Asp Lys Pro Thr	
	305 310 315 320	
	ATG ATC AAG GTG ACT ACA ACC ATT GGT TTT GGC TCG CCC AAC AAG GCA	1067
20	Met Ile Lys Val Thr Thr Thr Ile Gly Phe Gly Ser Pro Asn Lys Ala	
	325 330 335	
	AAC AGT TAC AGT GTA CAT GGA AGT GCA CTT GGA GCT AAG GAA GTA GAG	1115
	Asn Ser Tyr Ser Val His Gly Ser Ala Leu Gly Ala Lys Glu Val Glu	
	340 345 350	
25	GCC ACC AGG AGT AAC TTG GGA TGG CCT TAT GAG CCT TTC CAT GTG CCT	1163
	Ala Thr Arg Ser Asn Leu Gly Trp Pro Tyr Glu Pro Phe His Val Pro	
	355 360 365	
	GAA GAT GTC AAG AGC CAT TGG AGT CGT CAT GTT CCC GAG GGT GCT GCT	1211
30	Glu Asp Val Lys Ser His Trp Ser Arg His Val Pro Glu Gly Ala Ala	
	370 375 380	
	CTT GAA GCT GGG TGG AAT ACC AAG TTT GCT GAA TAT GAG AAG AAG TAC	1259
	Leu Glu Ala Gly Trp Asn Thr Lys Phe Ala Glu Tyr Glu Lys Lys Tyr	
	385 390 395 400	
35	CCA GAG GAA GCT GCA GAA CTC AAA TCC ATT ACT ACT GGT GAA CTA CCT	1307
	Pro Glu Glu Ala Ala Glu Leu Lys Ser Ile Thr Thr Gly Glu Leu Pro	
	405 410 415	
	GCT GGC TGG GAG AAA GCT CTT CCT ACC TAC ACA CCT GAA AGT CCA GCG	1355
40	Ala Gly Trp Glu Lys Ala Leu Pro Thr Tyr Thr Pro Glu Ser Pro Ala	
	420 425 430	
	GAT GCC ACC AGA AAC CTG TCC CAA CAA AAC CTG AAT GCT CTT GCC AAG	1403
	Asp Ala Thr Arg Asn Leu Ser Gln Gln Asn Leu Asn Ala Leu Ala Lys	
	435 440 445	
45	GTT CTT CCT GGT TTC CTT GGT GGT AGT GCT GAT CTT GCC TCA TCA AAC	1451
	Val Leu Pro Gly Phe Leu Gly Gly Ser Ala Asp Leu Ala Ser Ser Asn	
	450 455 460	
	ATG ACC CTC ATG AAA ATG TTT GGT GAC TTC CAA AAG AAC ACC CCA GAG	1499
50	Met Thr Leu Met Lys Met Phe Gly Asp Phe Gln Lys Asn Thr Pro Glu	
	465 470 475 480	

55

EP 0 723 017 A2

	GAG CGT AAT CTA AGG TTT GGT GTT CGT GAA CAT GGT ATG GGA GCC ATA	1547
	Glu Arg Asn Leu Arg Phe Gly Val Arg Glu His Gly Met Gly Ala Ile	
	485 490 495	
5	TGT AAT GGT AAT GCT CTA CAC AGC CCT GGC TTG ATT CCC TAC TGT GCT	1595
	Cys Asn Gly Asn Ala Leu His Ser Pro Gly Leu Ile Pro Tyr Cys Ala	
	500 505 510	
	ACT TTC TTT GTG TTC ACC GAC TAC ATG AGA GGA GCT ATG AGA ATT TCA	1643
10	Thr Phe Phe Val Phe Thr Asp Tyr Met Arg Gly Ala Met Arg Ile Ser	
	515 520 525	
	GCC TTG TCT GAG GCT GGA GTT ATT TAT GTT ATG ACC CAC GAT TCA ATT	1691
	Ala Leu Ser Glu Ala Gly Val Ile Tyr Val Met Thr His Asp Ser Ile	
	530 535 540	
15	GGT CTA GGA GAA GAT GGG CCT ACC CAT CAA CCC ATT GAG CAC TTG CCA	1739
	Gly Leu Gly Glu Asp Gly Pro Thr His Gln Pro Ile Glu His Leu Pro	
	545 550 555 560	
	AGT TTC CGT GCA ATG CCC AAC ATT CTG ATG TTC CGT CCA GCA GAT GGC	1787
20	Ser Phe Arg Ala Met Pro Asn Ile Leu Met Phe Arg Pro Ala Asp Gly	
	565 570 575	
	AAG GAG ACA GCG GGA GCT TAC AAG GTG GCT GTC CTC AAG AGG AAG ACA	1835
	Lys Glu Thr Ala Gly Ala Tyr Lys Val Ala Val Leu Lys Arg Lys Thr	
	580 585 590	
25	CCA TCA ATC CTT GCC CTC TCT CGG CAA AAG TTG CCA CAA CTT GCT GGA	1883
	Pro Ser Ile Leu Ala Leu Ser Arg Gln Lys Leu Pro Gln Leu Ala Gly	
	595 600 605	
	AGT TCT ATT GAA GGA GCA GCA AAG CGT GGC TAC ATT TTA TCA GAC AAT	1931
30	Ser Ser Ile Glu Gly Ala Ala Lys Arg Gly Tyr Ile Leu Ser Asp Asn	
	610 615 620	
	TCT TCT GGC AAC AAA CCT GAT GTC ATT TTG ATT GGT ACT GGC TCA GAG	1979
	Ser Ser Gly Asn Lys Pro Asp Val Ile Leu Ile Gly Thr Gly Ser Glu	
	625 630 635 640	
35	TTA GAA ATT GCT GTC AAG GCT GCT GAT GAA CTC AGG AAA GAA GGA AAA	2027
	Leu Glu Ile Ala Val Lys Ala Ala Asp Glu Leu Arg Lys Glu Gly Lys	
	645 650 655	
	GCA GTG AGA GTT GTT TCC TTT GTT TGT TGG GAG CTT TTT GAA GAA CAA	2075
40	Ala Val Arg Val Val Ser Phe Val Cys Trp Glu Leu Phe Glu Glu Gln	
	660 665 670	
	TCA GCC GAC TAC AAG GAA AGT GTC CTT CCA TCA TCT GTT ACA GCT AGA	2123
	Ser Ala Asp Tyr Lys Glu Ser Val Leu Pro Ser Ser Val Thr Ala Arg	
	675 680 685	
45	GTT AGC ATT GAG GCC GGA TCC ACA TTT GGG TGG GAG AAA TAT GTC GGA	2171
	Val Ser Ile Glu Ala Gly Ser Thr Phe Gly Trp Glu Lys Tyr Val Gly	
	690 695 700	
	TCA AAG GGG AAG GCC ATC GGA ATT GAC AGA TGG GGT GCC AGT GCC CCT	2219
50	Ser Lys Gly Lys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Trp Gly Ala Ser Ala Pro	
	705 710 715 720	

55

GCT GGA AAA ATA TAC AAG GAG TAC GGA ATT ACA GCA GAG GCT GTT GTA 2267
 Ala Gly Lys Ile Tyr Lys Glu Tyr Gly Ile Thr Ala Glu Ala Val Val
 5 725 730 735
 GCT GCA GCT AAA CAA GTT TCT T AGGCTTTATT ACTTACCCTT GGTGCTGGT 2319
 Ala Ala Ala Lys Gln Val Ser
 740
 GTCTACCAAA TTTGTTTCA TTTTGAACT GAGGTTGGAG ATAACGGTGG AAACCAATAC 2379
 10 CAAACGGACT CGGCAGTTCA CTGTTGCCCTG GTATTTTCAA TAAAACTAT TTCTTCATCT 2439
 GTCCTTTGTT TTCTTCAGTT TTAGTAGCGG AGCGGCCAAA ATGAATCCAA GATGAGGATA 2499
 GAAATAGGAT TATGGATGCT CCTGACCATG TACACTTAAA ACATATCTGT GAGTTTTGTA 2559
 ATTTTATTTG GTCGAGTGAT ACCAAGATCT CATTTTCAAT TGGAAAAAAA AAAAAAAAAA 2619
 15 AAAAAAAAAA 2629
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:
 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 743 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 20 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:
 25 Met Ala Ser Ser Ser Ser Leu Thr Leu Ser Gln Ala Ile Leu Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Val Pro Arg His Gly Ser Ala Ser Ser Ser Gln Leu Ser Pro Ser
 20 25 30
 Ser Leu Thr Phe Ser Gly Leu Lys Ser Asn Pro Asn Ile Thr Thr Ser
 30 35 40 45
 Arg Arg Arg Thr Pro Ser Ser Ala Ala Ala Ala Val Val Arg Ser
 50 55 60
 Pro Ala Ile Arg Ala Ser Ala Ala Thr Glu Thr Ile Glu Lys Thr Glu
 65 70 75 80
 35 Thr Ala Leu Val Asp Lys Ser Val Asn Thr Ile Arg Phe Leu Ala Ile
 85 90 95
 Asp Ala Val Glu Arg Gln Ile Arg Val Thr Arg Phe Ala Met Gly Cys
 100 105 110
 40 Ala Pro Met Gly His Ile Leu Tyr Asp Glu Val Met Arg Tyr Asn Pro
 115 120 125
 Lys Asn Pro Tyr Trp Phe Asn Arg Asp Arg Phe Val Leu Ser Ala Gly
 130 135 140
 45 His Gly Cys Met Leu Gln Tyr Ala Leu Leu His Leu Ala Gly Tyr Asp
 145 150 155 160
 Ala Val Arg Glu Glu Asp Leu Lys Ser Phe Arg Gln Trp Gly Thr Lys
 165 170 175
 Thr Pro Gly His Pro Glu Asn Phe Glu Thr Pro Gly Val Glu Val Thr
 180 185 190
 50 Thr Gly Pro Leu Gly Gln Gly Ile Ala Asn Ala Val Gly Leu Ala Leu
 195 200 205

55

EP 0 723 017 A2

Val Glu Lys His Leu Ala Ala Arg Phe Asn Lys Pro Asp Ala Glu Ile
210 215 220

5 Val Asp His Tyr Thr Tyr Val Ile Leu Gly Asp Gly Cys Gln Met Glu
225 230 235 240

Gly Ile Ser Gln Glu Ala Cys Ser Leu Ala Gly His Trp Gly Leu Gly
245 250 255

10 Lys Leu Ile Ala Phe Tyr Asp Asp Asn His Ile Ser Ile Asp Gly Asp
260 265 270

Thr Glu Ile Ala Phe Thr Glu Asp Val Gly Ala Arg Phe Glu Ala Leu
275 280 285

Gly Trp His Val Ile Trp Val Lys Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asp Glu
15 290 295 300

Ile Arg Ala Ala Ile Lys Glu Ala Lys Thr Val Thr Asp Lys Pro Thr
305 310 315 320

Met Ile Lys Val Thr Thr Thr Ile Gly Phe Gly Ser Pro Asn Lys Ala
325 330 335

20 Asn Ser Tyr Ser Val His Gly Ser Ala Leu Gly Ala Lys Glu Val Glu
340 345 350

Ala Thr Arg Ser Asn Leu Gly Trp Pro Tyr Glu Pro Phe His Val Pro
355 360 365

25 Glu Asp Val Lys Ser His Trp Ser Arg His Val Pro Glu Gly Ala Ala
370 375 380

Leu Glu Ala Gly Trp Asn Thr Lys Phe Ala Glu Tyr Glu Lys Lys Tyr
385 390 395 400

Pro Glu Glu Ala Ala Glu Leu Lys Ser Ile Thr Thr Gly Glu Leu Pro
30 405 410 415

Ala Gly Trp Glu Lys Ala Leu Pro Thr Tyr Thr Pro Glu Ser Pro Ala
420 425 430

Asp Ala Thr Arg Asn Leu Ser Gln Gln Asn Leu Asn Ala Leu Ala Lys
35 435 440 445

Val Leu Pro Gly Phe Leu Gly Gly Ser Ala Asp Leu Ala Ser Ser Asn
450 455 460

Met Thr Leu Met Lys Met Phe Gly Asp Phe Gln Lys Asn Thr Pro Glu
465 470 475 480

40 Glu Arg Asn Leu Arg Phe Gly Val Arg Glu His Gly Met Gly Ala Ile
485 490 495

Cys Asn Gly Asn Ala Leu His Ser Pro Gly Leu Ile Pro Tyr Cys Ala
500 505 510

45 Thr Phe Phe Val Phe Thr Asp Tyr Met Arg Gly Ala Met Arg Ile Ser
515 520 525

Ala Leu Ser Glu Ala Gly Val Ile Tyr Val Met Thr His Asp Ser Ile
530 535 540

Gly Leu Gly Glu Asp Gly Pro Thr His Gln Pro Ile Glu His Leu Pro
50 545 550 555 560

Ser Phe Arg Ala Met Pro Asn Ile Leu Met Phe Arg Pro Ala Asp Gly
565 570 575

55

Lys Glu Thr Ala Gly Ala Tyr Lys Val Ala Val Leu Lys Arg Lys Thr
 580 585 590
 5 Pro Ser Ile Leu Ala Leu Ser Arg Gln Lys Leu Pro Gln Leu Ala Gly
 595 600 605
 Ser Ser Ile Glu Gly Ala Ala Lys Arg Gly Tyr Ile Leu Ser Asp Asn
 610 615 620
 10 Ser Ser Gly Asn Lys Pro Asp Val Ile Leu Ile Gly Thr Gly Ser Glu
 625 630 635 640
 Leu Glu Ile Ala Val Lys Ala Ala Asp Glu Leu Arg Lys Glu Gly Lys
 645 650 655
 15 Ala Val Arg Val Val Ser Phe Val Cys Trp Glu Leu Phe Glu Glu Gln
 660 665 670
 Ser Ala Asp Tyr Lys Glu Ser Val Leu Pro Ser Ser Val Thr Ala Arg
 675 680 685
 20 Val Ser Ile Glu Ala Gly Ser Thr Phe Gly Trp Glu Lys Tyr Val Gly
 690 695 700
 Ser Lys Gly Lys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Trp Gly Ala Ser Ala Pro
 705 710 715 720
 25 Ala Gly Lys Ile Tyr Lys Glu Tyr Gly Ile Thr Ala Glu Ala Val Val
 725 730 735
 Ala Ala Ala Lys Gln Val Ser
 740

30

Patentansprüche

35

1. Protein mit Transketolase Aktivität, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ ID NO 2 darstellt.
2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die Teilsequenz 78-743 aus SEQ ID NO 2 enthält.
3. Protein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die in SEQ ID NO 2 dargestellte Sequenz enthält.
4. Nukleinsäure, codierend für ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1-3.
5. Nukleinsäure nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus der in SEQ ID NO 1 dargestellten Sequenz besteht.
6. Vektoren, enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 4 oder 5 zusammen mit funktionellen Regulationssignalen.
7. Verwendung eines Proteins gemäß Anspruch 1-3 zur Identifizierung von herbiziden Wirkstoffen.
8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifizierung mittels eines in vitro Testsystems erfolgt.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Testsystem ein Enzymhemmtest eingesetzt wird.

55

10. Testsystem zur Identifizierung von Transketolase-Inhibitoren, dadurch gekennzeichnet, daß man die potentiellen Inhibitoren mit einem Protein gemäß Anspruch 1-3 inkubiert und anschließend die Transketolase Aktivität bestimmt.

11. Herbizide Wirkstoffe, identifizierbar mittels eines Testsystems gemäß Anspruch 10.

12. Verfahren zur Herstellung von Herbiziden, die eine pflanzliche Transketolase inhibieren, dadurch gekennzeichnet, daß man bekanntechemische Verbindungen in einem Testverfahren gemäß Anspruch 10 überprüft und solche mit inhibierender Wirkung mit üblichen Träger- und Hilfsstoffen als Herbizid formuliert.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

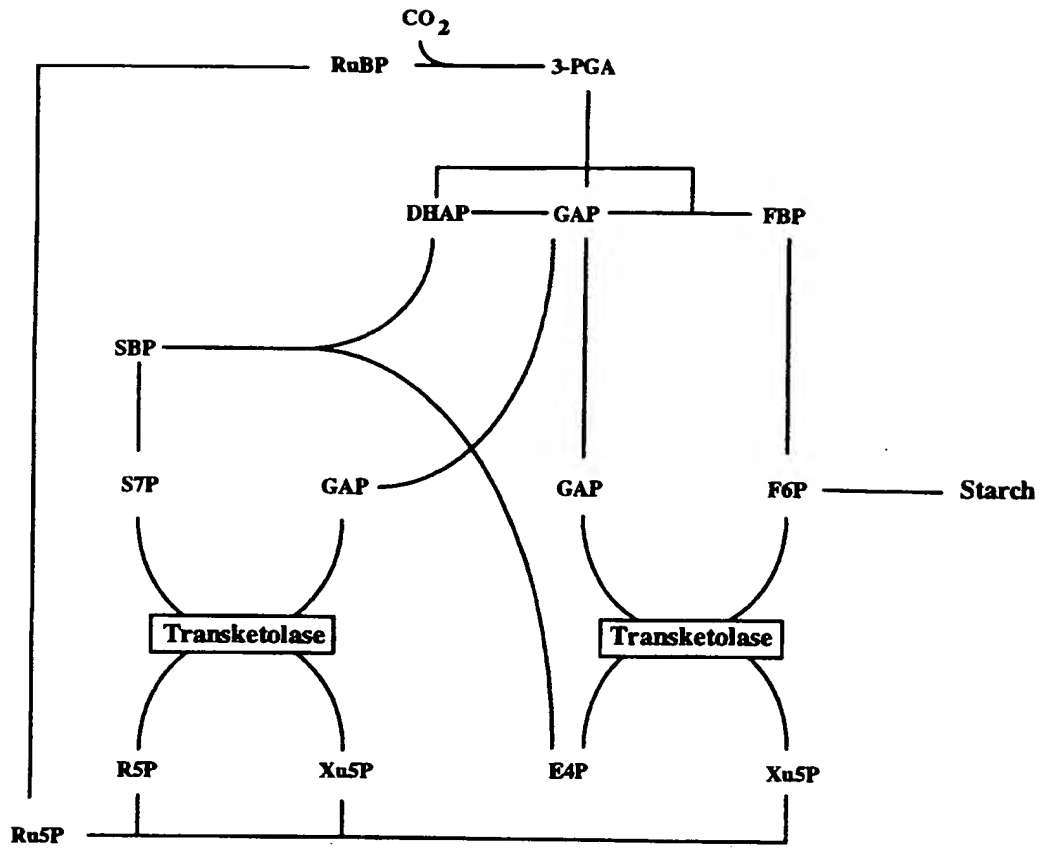


Abbildung 1

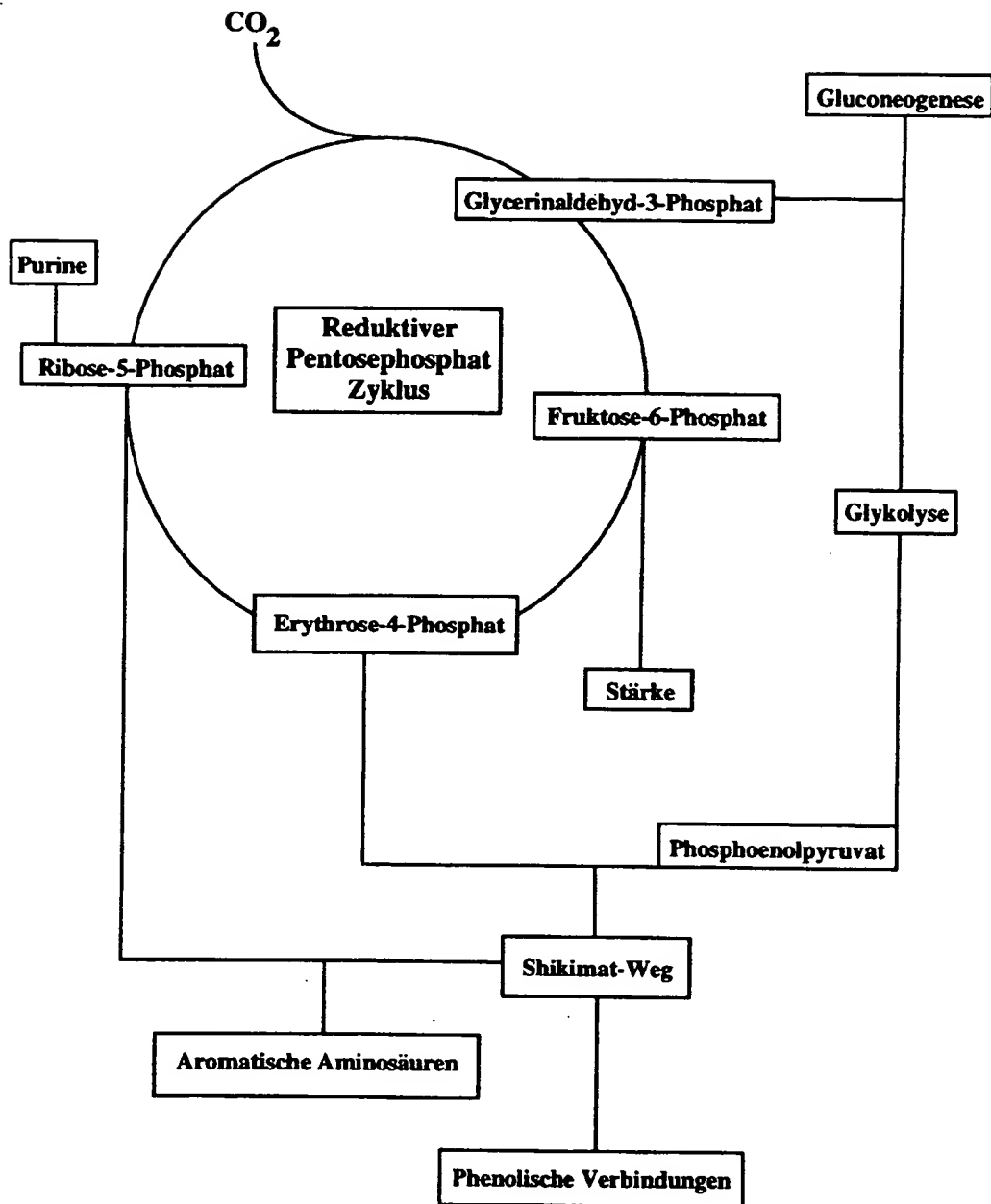


Abbildung 2

1	CTCCTCTTCA	CTCTCTTTTC	TCTTTGAGAC	AAAACATCAA	ACACCTTACT	50
51	GGTAAAGCCA	TGGCGTCTTC	TTCTTCTCTC	ACTCTCTCTC	AAGCTATCCT	100
101	CTCTCGTTCT	GTCCCTCGCC	ATGGCTCTGC	CTCTTCTTCT	CAACTTTCCC	150
151	CTTCTTCTCT	CACTTTTTTC	GGCCTTAAAT	CCAATCCCA	TATCACCACC	200
201	TCCCGCCGCC	GTACTCCTTC	CTCCGCCGCC	GCCGCCGCCG	TCGTAAGGTC	250
251	ACCGGCGATT	CGTGCCTCAG	CTGCAACCGA	AACCATAGAG	AAAACTGAGA	300
301	CTGCGCTTGT	TGACAAATCT	GTAACACAGA	TTGATTTTTT	GGCTATTGAT	350
351	GCTGTTGAAA	GGCAAATTCT	GGTCACCCGG	TTTGCCATGG	GTTGTGCTCC	400
401	GATGGGTCAT	ATATTGTACG	ATGAGGTTAT	GAGGTATAAC	CCGAAAAACC	450
451	CGTATTGGTT	TAATCGGGAT	CGGTTTGTTC	TATCAGCTGG	ACATGGTTGT	500
501	ATGCTTCAGT	ATGCTTTGCT	TCATCTAGCT	GGCTATGATG	CTGTCAGGGA	550
551	AGAGGACTTG	AAGAGCTTCC	GTCAGTGGGG	AAGCAAAACC	CCTGGACACC	600
601	CTGAAAACCT	TGAGACACCT	GGTGTGGAAG	TCACCACCCG	GCCTCTGGGA	650
651	CAAGGTATTG	CCAACGCCGT	TGGCTTGGCT	CTTGTGGAGA	AACACTTGCG	700
701	TGCTCGTTTC	AATAAGCCTG	ACGCTGAGAT	TGTAGACCAC	TACACATATG	750
751	TTATTCTCGG	TGATGGTTGC	CAGATGGAGG	GTATTTTACA	AGAAGCTTGT	800
801	TCCCTTGCTG	GACACTGGGG	ACTTGGAAG	CTGATTGCTT	TCTATGATGA	850
851	CAACCACATC	TCAATTGATG	GTGACACAGA	AATCGCTTTC	ACTGAGGATG	900
901	TTGGTGCCCG	TTTTGAGGCT	CTTGGGTGGC	ACGTAATCTG	GGTGAAGAAC	950
951	GGTAACACTG	GTTATGATGA	GATTCGTGCT	GCTATTAAGG	AAGCAAAAAC	1000
1001	TGTCACAGAC	AAACCCACTA	TGATCAAGGT	GACTACAACC	ATTGGTTTTG	1050
1051	GCTCGCCCAA	CAAGGCAAA	AGTTGAGTGA	TACATGGAAG	TGCACTTGA	1100
1101	GCTAAGGAAG	TAGAGGCCAC	CAGGAGTAAC	TTGGGATGGC	CTTATGAGCC	1150
1151	TTTCCATGTG	CCTGAAGATG	TCAAGAGCCA	TTGGAGTCGT	CATGTTCCCG	1200
1201	AGGGTGCTGC	TCTTGAAGCT	GGGTGGAATA	CCAAGTTTGC	TGAATATGAG	1250
1251	AAGAAGTACC	CAGAGGAAGC	TGCAGAACTC	AAATCCATTA	CTACTGGTGA	1300
1301	ACTACCTGCT	GGCTGGGAGA	AAGCTCTTCC	TACCTACACA	CCTGAAAGTC	1350
1351	CAGCGGATGC	CACCAGAAAC	CTGTCCCAAC	AAAACCTGAA	TGCTCTTGCC	1400
1401	AAGGTTCTTC	CTGGTTTCCT	TGGTGGTAGT	GCTGATCTTG	CCTCATCAAA	1450
1451	CATGACCCTC	ATGAAAATGT	TTGGTGACTT	CCAAAAGAAC	ACCCAGAGG	1500
1501	AGCGTAATCT	AAGGTTTGGT	GTTTCGTGAAC	ATGGTATGGG	AGCCATATGT	1550
1551	AATGGTAATG	CTCTACACAG	CCCTGGCTTG	ATTCCCTACT	GTGCTACTTT	1600
1601	CTTTGTGTTT	ACCGACTACA	TGAGAGGAGC	TATGAGAATT	TCAGCCTTGT	1650
1651	CTGAGGCTGG	AGTTATTTAT	GTTATGACCC	ACGATTCAAT	TGGTCTAGGA	1700
1701	GAAGATGGGC	CTACCCATCA	ACCCATTGAG	CACTTGGAAG	GTTTCCGTGC	1750
1751	AATGCCCAAC	ATTCTGATGT	TCCGTCCAGC	AGATGGCAAG	GAGACAGCGG	1800
1801	GAGCTTACAA	GGTGGCTGTC	CTCAAGAGGA	AGACACCATC	AATCCTTGCC	1850
1851	CTCTCTCGGC	AAAAGTTGCC	ACAACCTGCT	GGAAGTTCTA	TTGAAGGAGC	1900
1901	AGCAAAGGGT	GGCTACATTT	TATCAGACAA	TTCTTCTGGC	AACAAACCTG	1950
1951	ATGTCATTTT	GATTGGTACT	GGCTCAGAGT	TAGAAATTGC	TGTCAAGGCT	2000
2001	GCTGATGAAC	TCAGGAAAGA	AGGAAAAGCA	GTGAGAGTTG	TTTCCTTTGT	2050
2051	TTGTTGGGAG	CTTTTTGAAG	AACAATCAGC	CGACTACAAG	GAAAGTGTC	2100
2101	TTCCATCATC	TGTTACAGCT	AGAGTTAGCA	TTGAGGCCGG	ATCCACATTT	2150
2151	GGGTGGGAGA	AATATGTCGG	ATCAAAGGGG	AAGGCCATCG	GAATTGACAG	2200
2201	ATGGGGTGCC	AGTGCCCTTG	CTGGAATAAT	ATACAAGGAG	TACGGAATTA	2250
2251	CAGCAGAGGC	TGTTGTAGCT	GCAGCTAAAC	AAGTTTCTTA	GGCTTTATTA	2300
2301	CTTACCCTTG	GTGCTGGTG	TCTACCAAAT	TTGTTTTCAT	TTTGAAACTG	2350
2351	AGGTTGGAGA	TAACGGTGGA	AACCAATACC	AAACGGACTC	GGCAGTTCAC	2400
2401	TGTTGCCTGG	TATTTTCAAT	AAAAACTATT	TCTTCATCTG	TCCTTTGTTT	2450
2451	CTTTCAGTTT	TAGTAGCGGA	GCGGCCAAAA	TGAATCCAAG	ATGAGGATAG	2500
2501	AAATAGGATT	ATGGATGCTC	CTGACCATGT	ACACTTAAAA	CATATCTGTG	2550
2551	AGTTTTTGTA	TTTTATTTGG	TCGAGTGATA	CCAAGATCTC	ATTTTCAATT	2600
2601	GGAAAAAAA	AAAAAAA	AAAAAAA			2629

Abbildung 3

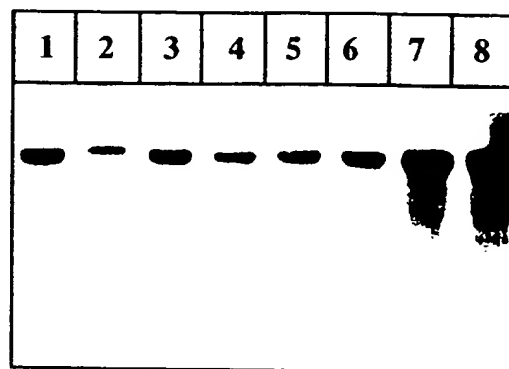
Aminosäurevergleich der plastidären Transketolase aus Tabak mit Transketolase

Isoenzymen aus *Saccharomyces carvesiae*

TK-23	1							MASSSSL TLSQAILSR	17
TK-23	18	VPRHGSASSS	QLSPSSLTFS	GLKSNPNITT	SRRTTPSSAA	AAAVVRSPAI	RASAATETIE		77
TK-23	78	KTETALVDKS	-VNTIRFLAI	DAVERQIRVT	RFAMGCAPMG	HILYDEVTRY	NPKNPYWFNR		136
TKL1	1	M.QFTDI..L	A.S...I..V	.T.SKANS	PG.PLGMAPA	AHVLWSQ..M	..T..D.I..		60
TKL2	1	MAQFSDI..L	A.S.L.L.SV	.Q..SAQSGH	PG.PLGLAPV	AHVIFKQL.C	..N.EH.I..		60
TK-23	137	DRFVLSAGHG	CMLQYALLHL	AGYDAVREED	LKSPRQWGSK	TPGHPENFET	PGVEVTGPL		196
TKL1	61N..A	VA.L.SM...	T...L-SI..	..Q...L..R-..L		118
TKL2	61N..S	.A.L.SM...	L...Y-SI..	.RQ...VN.R-..HS	A...I.S...		118
TK-23	197	GQGIANAVAL	ALVEKHLAAR	FNKPDAEIVD	HYTYVILGDG	COMEGISQEA	CSLAGHWGLG		256
TKL1	119S....M	.MAQAN...T	Y...GFTLS	N....F....	.LQ....S..	S....LK..		178
TKL2	119S....M	.IAQANF...T	Y.EDGFP.S	S..FA.V...	.LQ..V.S.T	S....LQ..		178
TK-23	257	KLIAFYDDNH	ISIDGDTEIA	FTEDVGARFE	ALGWHVIVVK	NGNTGYDEIR	AAIKEAKTVT		316
TKL1	179	N...I....K	.T...A.S.S	.D...AK.Y.	.Y..E.LY.E	...EDLAG.A	K..AQ..LSK		238
TKL2	179	N..T...S.SK.SYS	.D...LK.Y.	.Y..E.ME.D	K.DDDMES.S	S.LEK..LSK		238
TK-23	317	DKPTMIKVT	TIGFGSPNKA	NSYSVHGSAL	GAKEVEATRS	NLGW-PYEPF	HVPEDVKSHW		375
TKL1	239L..M..	...Y..LHAG	-H....AP.	K.DD.KQLKS	KF.FN.DKS.	V..QE.YDHY		297
TKL2	239I.....LQQG	TA-G.....	K.DD.KQLKK	RW.FD.NKS.	V..QE.YDYY		297
TK-23	376	SRHVPEGAAL	EAG-WNTKFA	EYEKYPPEEA	AELKSITTGE	LPAGWEKALP	TYTPESPADA		434
TKL1	298	QKTILKPGVE	ANNK.NKL.S	..Q..F..LG	A..ARRLS.Q	...N..SK..	...AKDS.V.		357
TKL2	298	KKT.V.PGQK	LNEE.DR-.E	..KT.F..KG	K..QRRLN.E	..E...KH..	KF..DDD.L.		356
TK-23	435	TRNLSQQNLN	ALAKVLPGLF	GGSADLASSN	MTLMKMFPGDF	QKNTPEERN-	LRFVREHGM		493
TKL1	358	..KL.ETV.E	DVYNQ..ELITP..	L.RWKEAL..	.PPSSGSG.Y	SGRYI.YGIR		417
TKL2	357	..KT...V.T	NMVQV..ELITP..	L.RWEGAV..	.PPITQLG.Y	AGRYI.YGVR		416
TK-23	494	----GAICNG	NALHSPGLIP	YCATTFFVTD	YMRGAMRISA	LSEAGVIYVM	THDSIGLGED		549
TKL1	418	EHAM...M..	ISAFGANYK.	.GG..LN.VS	.AA..V.L..	..GHP..W.AV...		477
TKL2	417	EHG-...M..	ISAFGANYK.	.GG..LN.VS	.AA..V.LA.	..GNP..W.A		475
TK-23	550	GPTHQPIEHL	ASFRAMPNIL	MFRPADGKET	AGAYKVAVLK	RKTPSILALS	RQKLPLAGS		609
TKL1	478T..	.H..SL...Q	VW.....N.V	SA...NSLES	KH....I...	..N....E..		537
TKL2	476T..	.HL..I..HV	-W.....N.T	SA..YS.IKS	GR...VV...	..N....EH.		534
TK-23	610	SIEGAAGGY	ILSDNSSGNK	PDVILIGTGS	ELEIAVKAAD	ELR-KEGRAV	RVSFVCWEL		668
TKL1	538	...S.S....	V.Q.VA---N	..I..VA...	.VSL.S.E..K	T.AA.NI..-	...LPDFFT		593
TKL2	535	.F.K.L....	VIH.VE---N	..I..VS...	.VS.SID..K	K.YDTKKIKA	...LPDFYT		591
TK-23	669	FEEQSADYKE	SVLPSSVTAR	VSIEAGSTFG	WEKYVGSKGK	AIGIDRWGAS	APAGRIYKEY		727
TKL1	595	.DK.PLE.RLDN.PIM	-V.VLA.TC	.G..AHQSFG	IDRFGAS.KA	PEVF.FFGFT		652
TKL2	592	.DR..EE.RFDG.PIM	-F.VLA.SS	.G..AHQSFG	LDEFGRS.KG	PEIY.LFDFT		650
TK-23	728	GITAEAVVAA	AKQVS						743
TKL1	653	PEGVAERAQK	TIAFYKGDKL	ISPLKKAF					680
TKL2	651	ADGVASRAEK	TINYKKGKQL	LSPMGRAF					678

Abbildung 4

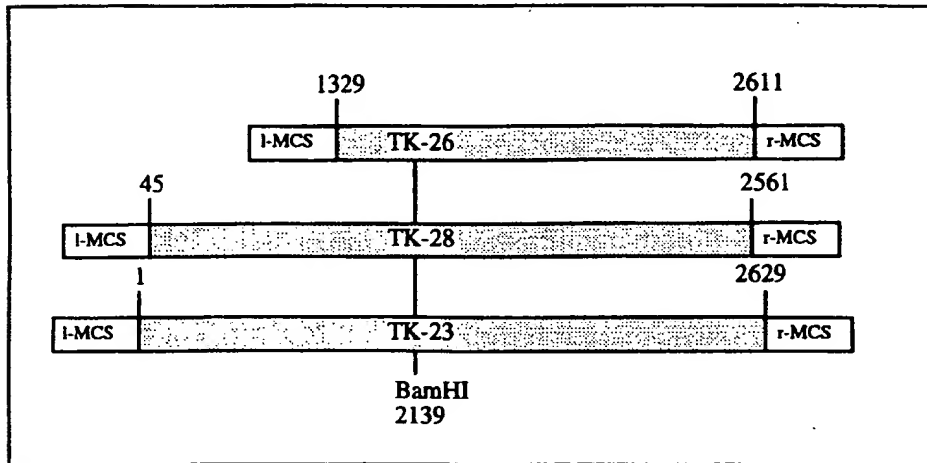
Gewebespezifische Expression der plastidären Transketolase in Tabakpflanzen



Legende: Spur 1, Sink-Blatt; Spur 2, Source-Blatt; Spur 3, Blütenknospe;
Spur 4, Internodien; Spur 5, Nodien; Spur 6, Cortex; Spur 7, Wurzel;
Spur 8, geöffnete Blüte

Abbildung 5

Aufbau der Transketolase cDNA-enthaltenden Plasmide



I-MCS: Linke Polylinkersequenz

SacI-----SacII-----NotI-----XbaI-----SpeI-----BamHI-----SmaI-----PstI-----EcoRI-----NotI
 5'- GAGCTCACC GCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCC CCGGGCTGCAGGAATTCGCGGCCGC-3'

r-MCS: Rechte Polylinkersequenz

NotI-----EcoRI-----EcoRV-----HindIII-----Sall-----HincII-----XbaI-----KpnI
 5'- GCGGCCGCGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGCCCCGGTACC-3'

Abbildung 6

Konstruktion pflanzlicher Expressionskassetten zur Antisense-Inhibierung der plastidären Transketolase

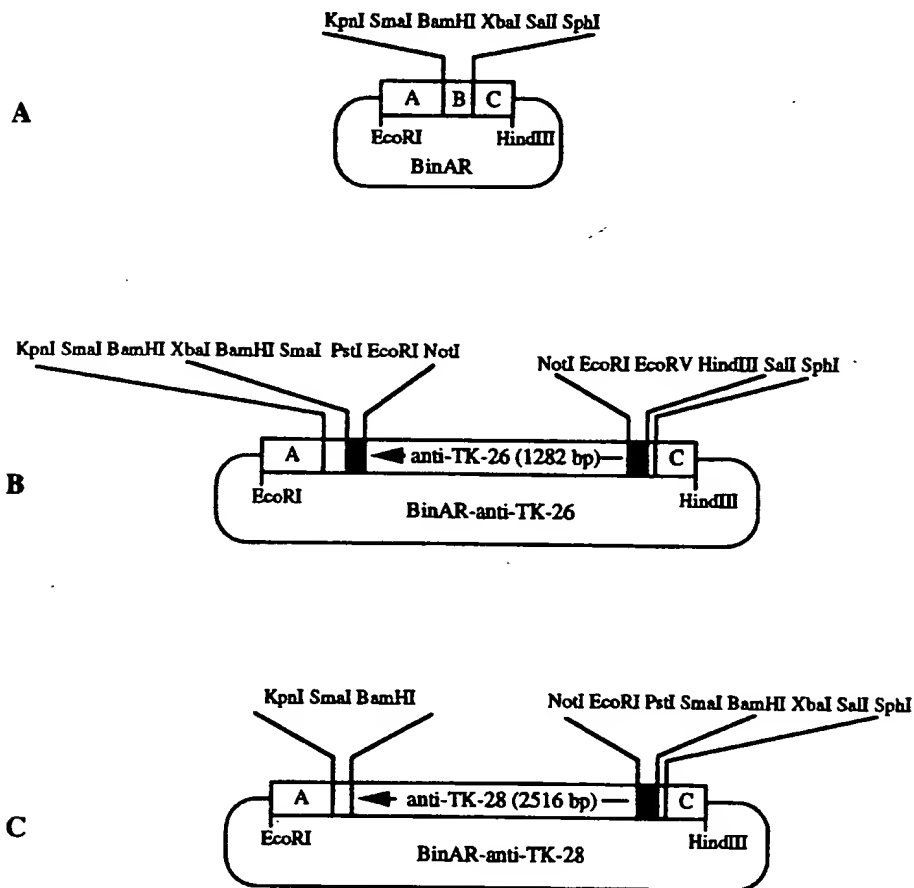
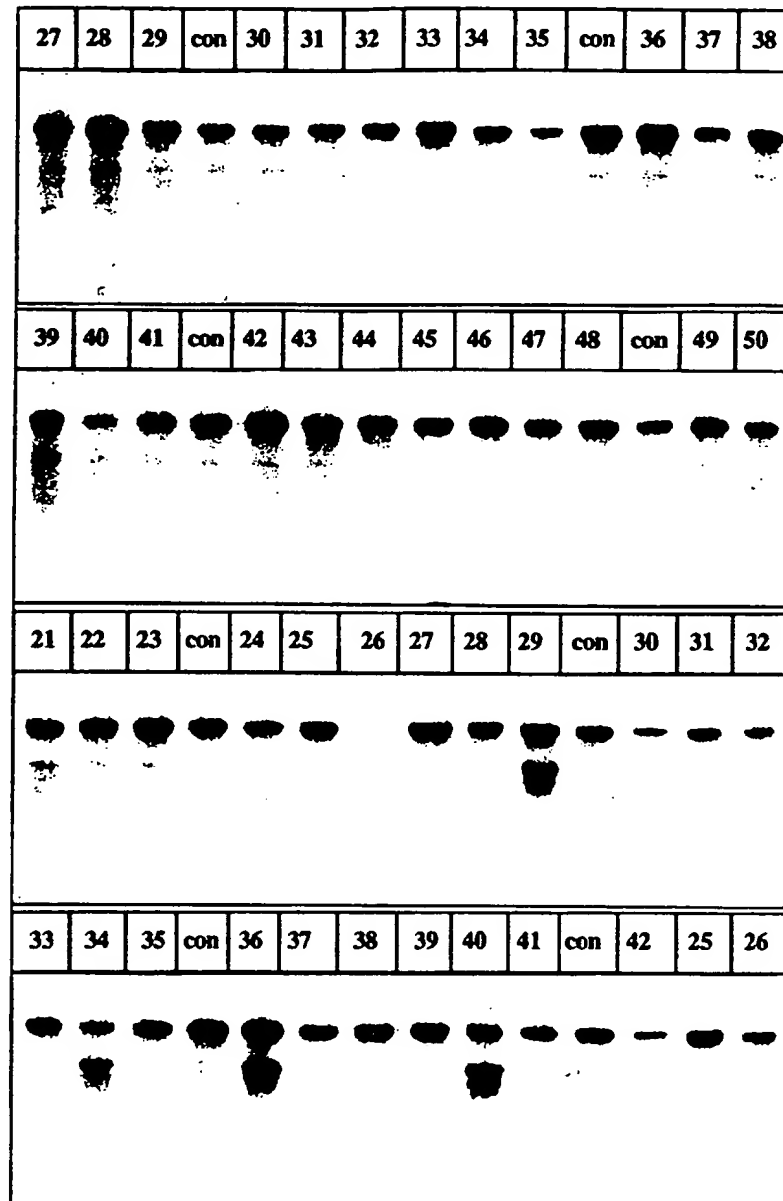


Abbildung 7

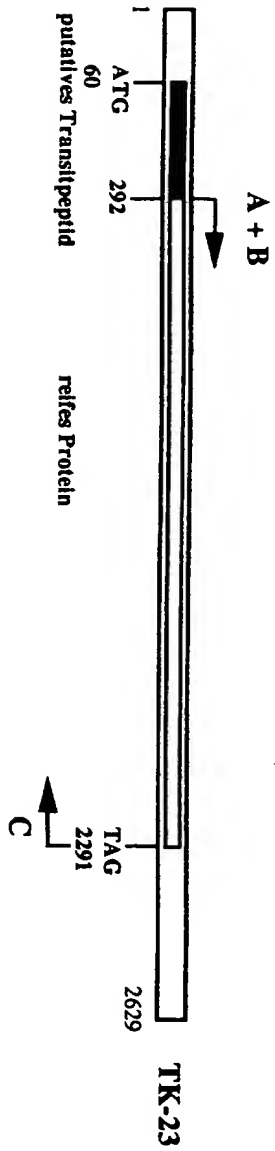
**Antisense Inhibierung der plastidären Transketolase in transgenen Tabakpflanzen:
RNA-Analyse der Transformanten in Gewebekultur**



Legende: Nummern, Bezeichnung der einzelnen unabhängigen Transformanten; con, untransformierte Kontrolle; A und B, Antisense-Konstrukt TK-28; C und D, Antisense-Konstrukt TK-26

Abbildung 8

PCR-Amplifikation der plasmidären Transketolase



PCR-Primer:

A: 5'-AA GTC GAC GAA TTC AAA ATC GAG ACT GCG CTT GTT GAC-3'
 38mer SalI EcoRI TK reifes Protein

B: 5'-AA GAA TTC ATG CAT CAT CAT CAT CAT CAT AAA ATC GAG ACT GCG CTT GTT GAC-3'
 53mer EcoRI Met 6 x His TK reifes Protein

C: 5'-TT GTC GAC GAA TTC CTA AGA AAC TTG TTT AGC TGC AGC-3'
 38mer SalI EcoRI Stop

Abbildung 9

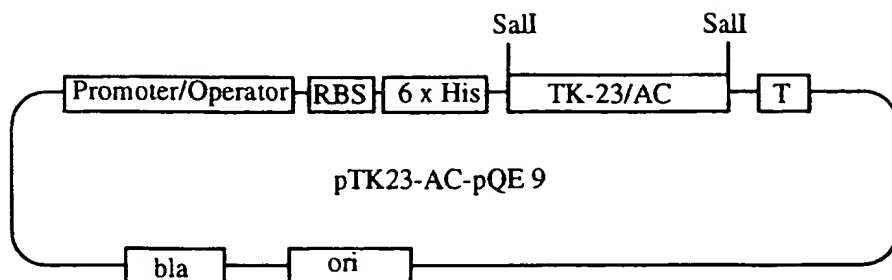


Abbildung 10

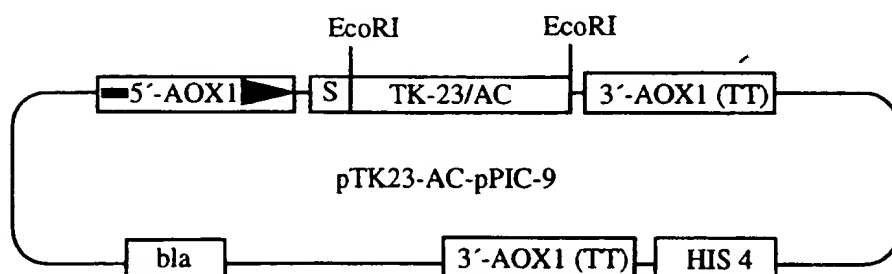


Abbildung 11

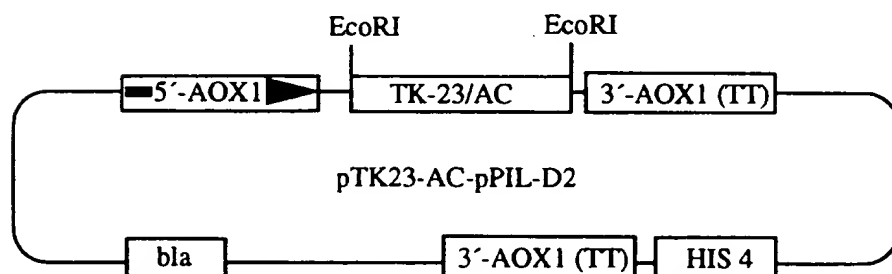


Abbildung 12

Expression der plastidären Transketolase in *E. coli* Zellen

Bakterienkultur	Kontrolle	TK-Antisense	TK-Sense			
IPTG	+	-	+	-	+	-

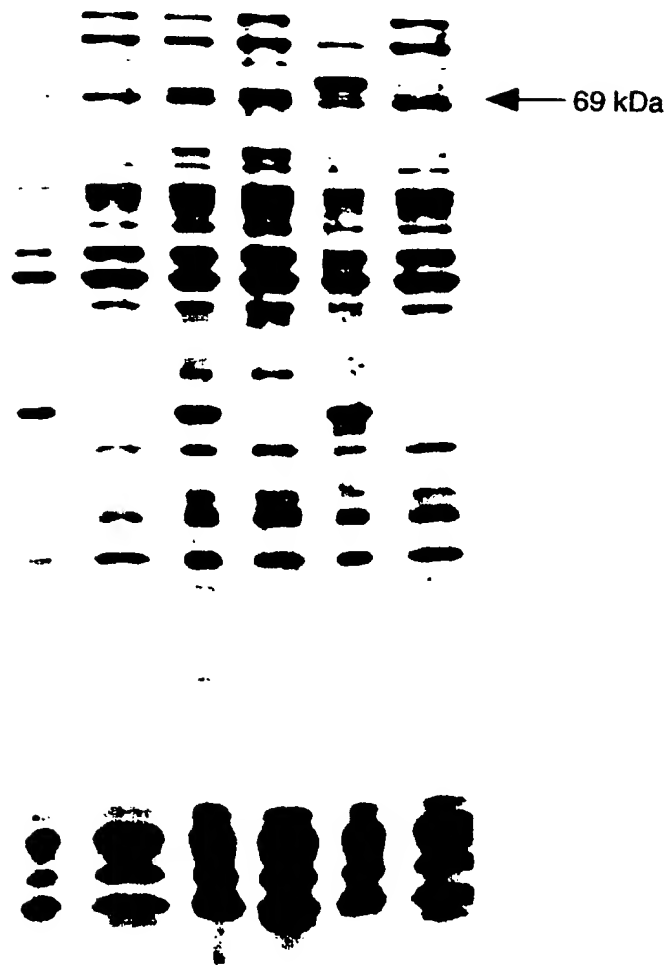


Abbildung 13